مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۳۳، شماره ۲، سال ۱۳۹۶

اثر نمک‌های نیترات‌آمونیوم و کلرورکلسیم در پرآوری و بهبود کیفیت شاخساره‌های درون شیشه پایه‌های پررشد گلابی

Effects of Ammonium Nitrate and Calcium Chloride Salts on Proliferation and Improvement of *In Vitro* Shootlets Quality of Vigorous Pear Rootstocks

معصومه منصوریار[۱]، حمید عبداللهی[۲]، جواد عرفانی‌مقدم[۳]، میترا میرعبدالباقی[۴] و سیدعلیرضا سلامی[۵]

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام
۲ و ۴- به ترتیب دانشیار و استادیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشارزی، کرج، ایران
۵- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۴

چکیده

منصوریار، م.، عبداللهی، ح.، عرفانی‌مقدم، ج.، میرعبدالباقی، م. و سلامی، س. ع. ۱۳۹۶. اثر نمک‌های نیترات‌آمونیوم و کلرورکلسیم در پرآوری و بهبود کیفیت شاخساره‌های درون شیشه پایه‌های پررشد گلابی. **مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۳۳: ۲۶۶- ۲۴۹.**

تکثیر همگروه پایه‌های پررشد گلابی از طریق ریزازدیادی انجام می‌شود و از مشکلات تکثیر این پایه‌ها، تولید شاخه‌چه‌های کوچک و پرآوری پائین آن‌ها در شرایط درون شیشه است. به منظور بهبود کیفیت شاخه‌چه‌های درون شیشه، اثر نمک‌های نیترات‌آمونیوم و کلرورکلسیم روی پایه‌های گلابی Q1 (*Pyrus communis×P. ussuriensis* Rehd.)، *P. betulifolia* و پایه بومی کنجونی (*P. communis×P. ussuriensis* Rehd.) در کنار شاهد دانهال درگزی در محیط گزینش شده QL مورد تحقیق قرار گرفت. نمک نیترات‌آمونیوم در غلظت‌های ۶/۲۵ (شاهد محیط QL)، ۱۲/۵ و ۱۸/۷۵ میلی‌مولار و کلرورکلسیم در غلظت‌های صفر (شاهد محیط QL)، ۰/۹ و ۱/۸ میلی‌مولار بر میزان پرآوری، کیفیت شاخه‌چه‌ها و جذب عناصر نیتروژن و کلسیم در پایه‌های فوق بررسی شد. در اکثر محیط‌ها، پایه *P. betulifolia* دارای رشد زیاد و پرآوری کم بود و پایه Q1 پرآوری نسبتاً بالاتری در مقایسه با دیگر پایه‌ها داشت. افزایش مقدار نیترات‌آمونیوم سبب کاهش در پرآوری ریزنمونه‌ها شد و با افزایش مقدار کلرورکلسیم، سطح برگ توسعه یافت. مقدار جذب عناصر نیتروژن و کلسیم در همه پایه‌ها بالاتر از مقدار بحرانی بود و افزایش نمک نیترات‌آمونیوم سبب افزایش سطح جذب نیتروژن برای پایه *P. betulifolia*، Q1، کنجونی و دانهال درگزی به ترتیب به میزان ۷/۵۸، ۴/۳۱، ۵/۷۸ و ۶/۲۴ درصد شد. برعکس بالاترین درصد کلسیم جذب شده برای سه پایه *P. betulifolia*، Q1 و پایه کنجونی در پائین‌ترین غلظت کلرورکلسیم مشاهده شد. وجود بالاترین سطح کلسیم در بیش‌تر پایه‌ها در کم‌ترین سطح نیترات آمونیوم نشان دهنده تاثیر منفی این نمک در جذب کلسیم در این شرایط بود.

واژه‌های کلیدی: گلابی، کشت بافت، پایه پابلند، *Pyrus betulifolia*، کنجونی، دانهال درگزی، پایه Q1.

نویسنده مسئول: hamidabdollahi@areeo.ac.ir تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۲۵۴۱

مقدمه

پایه‌های درخت گلابی در سه گروه پایه‌های بسیار پابلند و پابلند نظیر دانهال‌های بذری *Pyrus calleryana* Decne. و دانهال‌های بذری رقم درگزی، پایه‌های نیمه پاکوتاه کننده نظیر پایه‌های پیرودوارف (Pyrodwarf) و کوئینس A، و پایه‌های پاکوتاه کننده و بسیار پاکوتاه کننده نظیر OH×F51 Delbard® (بروکلی-Brokly)، کوئینس C و دانهال‌های بذری گونه ولیک (*Crataegus* sp.) قابل تقسیم‌بندی هستند (Abdollahi, 2010). هر گروه از پایه‌های فوق، کاربرد خاص داشته و گرایش باغداری به پرورش باغ‌های متراکم (Intensive)، سبب عدم استفاده از پایه‌های پابلند خصوصاً به دلیل مقاومت آن‌ها به تنش‌های محیطی نشده است (Fischer, 2009).

پایه‌های پابلند یا پررشد گلابی به گونه‌های مختلف مشتمل بر گلابی معمولی و گونه‌های شرقی نظیر *P. calleryana* Decne.، *P. ussuriensis* Maxim. و *P. betulifolia* Bunge. تعلق دارند (Hancock and Lobos, 2008). پایه‌های پاکوتاه و نیمه‌پاکوتاه گلابی آستانه تحمل محدودی به تنش‌های محیطی داشته، در حالی که پایه‌های پابلند اغلب به عنوان منابع تحمل به خاک‌های مرطوب، خشکی، بیماری آتشک، سرمای زمستانه، پسیل گلابی و خاک‌های رسی معرفی می‌شوند (Fischer, 2009؛ Hancock and Lobos, 2008). گونه گلابی معمولی یا *P. communis* بومی اروپا، آسیای صغیر و ایران بوده (Hancock and Lobos, 2008) و جاده ابریشم و به‌ویژه فلات ایران در فراهم آوردن منطقه‌ای برای تلاقی گونه‌های شرقی و با گونه گلابی معمولی و ایجاد دورگ‌های بین گونه‌ای نقش مهمی داشته است (Nikzad Gharehaghaji *et al.*, 2014). این رابطه خویشاوندی و مسیر ژنی با استفاده از روش شناسائی آلل‌های S (Babaei *et al.*, 2011؛ Nikzad Gharehaghaji *et al.*, 2014) و نشانگر مولکولی توالی‌های ساده تکراری یا SSRs (Erfani *et al.*, 2012) مورد بررسی قرار گرفته است. رقم گلابی درگزی از جمله ارقام شمال شرق ایران است که ضمن رابطه ژنتیکی با گلابی‌های شرقی (Erfani *et al.*, 2012)، از جمله مهم‌ترین ارقام مورد استفاده برای تولید بذر و ایجاد دانهال‌های بذری در نهالستان‌های کشور است (Abdollahi, 2010). بذر حاصل از این رقم دارای درصد جوانه‌زنی بالا بوده و دانهال‌های حاصل از آن سازگاری کامل با ارقام مختلف تجاری گلابی داخلی دارند (Abdollahi *et al.*, 2012). تحمل نسبی به شرایط نامساعد تنش‌زای محیطی، نظیر خشکی و بیماری آتشک، چه در رقم گلابی درگزی و چه در دانهال‌های حاصله، می‌توانند به دلیل وجود قرابت خویشاوندی این رقم با گلابی‌های شرقی باشد.

با توجه به مزایای کاربرد گلابی‌های شرقی به عنوان پایه خصوصاً در شرایط وجود تنش‌های محیطی، استفاده از انواع گزینش شده آن‌ها می‌تواند به عنوان گزینه‌ای برای خاک‌های خشک کشور باشد. پایه‌های شرقی به سختی با استفاده از روش قلمه قابل تکثیر هستند (Campbell, 2003) و در شرایط درون شیشه نیز از میزان ریشه‌زائی پائین‌تری در مقایسه با پایه‌هائی نظیر پیرودوارف و یا برخی دورگ‌های الدهم × فارمینگدال نظیر OH×F87 برخوردارند (Mansouryar *et al.*, 2016؛ Nourmohammadi *et al.*, 2015). در جمع‌بندی انجام شده توسط شورو و همکاران (Chevreau *et al.*, 1992) در حالی که در اغلب ژنوتیپ‌های گلابی متعلق به گونه *P. communis* میزان ریشه‌زائی بالائی گزارش شد، در دیگر گونه‌های گلابی به‌ویژه گونه‌های شرقی، میزان موفقیت در ریشه‌زائی به ندرت بیش از ۵۰ درصد دیده شد. همچنین در بررسی وادا و همکاران (Wada *et al.*, 2015a, b) میزان پرآوری پائینی در دو رقم شرقی سیون سومی (Sion Szu Mi) متعلق به گونه *P. pyrifolia* و هانگ‌پالی (Hang Pa Li) متعلق به گونه *P. ussuriensis* گزارش شد، در حالی که میزان پرآوری و رشد شاخه‌چه‌ها در پایه OH×F87 متعلق به گونه گلابی معمولی بیش‌تر بود. در بررسی براردی و همکاران (Berardi *et al.*, 1993) نیز میزان موفقیت در ریشه‌زائی نزدیک ۲۷ درصد برای پایه *P. calleryana* گزارش شد و میزان مشابهی نیز از ریشه‌زائی در بررسی شیبلی و همکاران (Shibli *et al.*, 1997) در پایه‌های بذری حاصل از گونه گلابی *P. syriaca* مشاهده و گزارش شده است. همچنین محیط QL (Quoirin and Lepoivre, 1977) که بیش‌تر برای تکثیر درون شیشه گیاهان چوبی خانواده گلسرخیان طرح ریزی شده است، دارای بیش‌ترین تغییرات در میزان دو عنصر کلیدی کلسیم (Ca) و نیتروژن (N) می‌باشد. همچنین افزایش نسبی کلسیم و تغییر نوع تامین کننده نیتروژن (N) در این محیط نسبت به محیط MS، (Murashige and Skoog, 1962) اثرهای نسبتاً مطلوبی روی ریزازدیادی برخی ارقام گلابی نشان داده است (Abdollahi *et al.*, 2005).

بررسی‌های فوق نشان دهنده این است که اگرچه گونه گلابی معمولی یا *P. communis* و پایه‌های حاصل از آن در شرایط معمول و با استفاده از قلمه به سختی قابل تکثیر است، لیکن ظاهراً در شرایط درون شیشه یکی از سهل‌ریشه‌زاترین گونه‌ها و پایه‌های گلابی متعلق به جنس Pyrus است. از طرفی، مروری بر بررسی‌های قبلی روی تحقیقات پایه برای درخت گلابی در کشور نشان دهنده خلاء تحقیقاتی در رابطه با کاربرد دیگر گونه‌ها و استفاده از گونه‌های شرقی به عنوان پایه است. در این راستا، اولین دلیل عدم توجه کافی به این

گونه‌ها و در نتیجه عدم دسترسی به گونه‌های فوق توسط تولیدکنندگان نهال در کشور بوده است و دیگر دلیل این موضوع بدون شک دشواری تکثیر و ریشه‌زائی تعداد محدودی پایه بوده است که طی دهه‌های گذشته به کشور وارد و در برخی مناطق نظیر دشت قزوین مورد استفاده قرار گرفته است. شناخت اخیر برخی از تولیدکنندگان نهال و باغداران نسبت به این پایه‌ها، سبب شده که تکثیر درون‌شیشه انواع محدودی از پایه‌های شرقی در کشور از نظر تحقیقاتی (Mansouryar *et al.*, 2016) و نیز تولید نیمه‌انبوه مد نظر تولیدکنندگان کشت بافتی قرار گیرد.

با در نظر گرفتن مشکلات تکثیر پایه‌های فوق در شرایط درون شیشه، به منظور افزایش کارآئی پرآوری و بهبود کیفیت شاخه‌چه‌های درون شیشه شماری از این پایه‌ها، و با توجه به اهمیت عناصر کلسیم (Ca) و نیتروژن (N) برای تکثیر درون شیشه گلابی، در این تحقیق اثر این دو عنصر در پرآوری و سطح جذب عناصر فوق در ریزشاخه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از نمونه‌های گیاهی پایه‌های پر رشد گلابی شامل پایه بذری درگزی (*P. communis*)، کنجونی یا گنجونی (*P. communis* × *P. ussuriensis*) که یک (پایه رویشی قدیمی متحمل به خشکی از منطقه اصفهان، دو رگ احتمالی بین دو گونه گلابی معمولی و گلابی یوزوری است (Babaei *et al.*, 2011؛ Erfani *et al.*, 2012)، پایه بتولیفولیا (*P. betulifolia*) با خصوصیت شاخص تحمل به خشکی (Fischer, 2009؛ Hancock and Lobos, 2008) و پایه همگروه پررشد گزینش شده Q1 یا Gh1 (پایه معروف به پایه خارجی گزینش شده از باغ‌های قدیمی دشت قزوین احداث شده توسط شرکت عمران قزوین روی پایه‌های وارداتی از فلسطین اشغالی در دهه ۵۰ شمسی) (*P. communis*×*P. ussuriensis* Rehd.) استفاده شد. مواد گیاهی مورد استفاده در کلکسیون گونه‌های گلابی پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری موسسه تحقیقات علوم باغبانی در کرج به صورت گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. زیرکشت ریزنمونه‌های موردنظر که به صورت جوانه‌های جانبی حاصل از مرحله استقرار بودند بر روی محیط کشت پایه QL (Quoirin and Lepoivre, 1977) به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۱۱ گرم در لیتر آگار و ۰/۵ گرم در لیتر پکتین، انجام شد. pH محیط در حدود ۰/۱ ± ۵/۷ قبل از انجام اتوکلاو تنظیم و زمان ضدعفونی محیط ۲۰ دقیقه در فشار ۱/۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه‌سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. کشت‌ها در اتاق رشد با دمایی معادل ۱ ± ۲۵

درجه سانتی‌گراد برای روز و ۱ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد برای شب، با طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت و شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه که توسط لامپ‌های فلورسنت ایجاد می‌شد، برای رشد قرار داده شدند. در بخش اول تحقیق، بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف نمک‌های پر مصرف نیترات آمونیوم و کلرورکلسیم روی خصوصیات رشد درون شیشه ریزنمونه‌های پایه‌های پر رشد گلابی انجام شد. این بررسی به صورت فاکتوریل با سه عامل نیترات آمونیوم (Merck, Germany) در سه سطح ۶/۲۵ (شاهد محیط QL)، ۱۲/۵ و ۱۸/۷۵ میلی‌مولار به ترتیب معادل ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر و عامل کلرورکلسیم (Merck, Germany) در سه سطح صفر (شاهد محیط QL)، ۰/۹ و ۱/۸ میلی‌مولار به ترتیب معادل صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر و عامل نوع پایه نیز در چهار سطح و در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار و پنج نمونه در هر کرت آزمایش انجام شد. با توجه به دوره رشد مطلوب ۴۵ روزه گلابی در شرایط درون شیشه، ارزیابی خصوصیات رشدی شاخه‌چه‌هی پرآوری شده شامل تعداد برگ، تعداد ریزشاخه به ازاء ریزقلمه، طول ریزشاخه و میزان توسعه سطح برگ به صورت ضرب طول در عرض برگ با در نظر گرفتن ضریب ۰/۷ برای برگچه‌های درون شیشه گلابی، پس از طی دو دوره زیر کشت متوالی ۱/۵ ماهه یادداشت برداری شد.

در پایان دوره ۴۵ روزه دوم، به منظور مقایسه پایه‌های فوق در قدرت جذب عناصر نیتروژن و کلسیم در تیمارهای مختلف، زیرنمونه‌ها در سه تکرار برداشت و مورد بررسی قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری نیتروژن کل در گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای، از اصول کلی روش کجلدال استفاده شد. در مرحله هضم، کلیه فرم‌های آلی و معدنی نیتروژن موجود در بافت گیاه، در مجاورت اسیدسولفوریک و سالیسیلیک، و در حرارت شدید به فرم آمونیوم درآمد. برای این منظور نمونه‌های گیاهی رشد یافته در آون به مدت ۴۸ ساعت خشک و سپس آسیاب شدند. ۰/۳ گرم از بافت پودر شده هر نمونه توزین و به بالون ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد و ۱۰ میلی‌لیتر از مخلوط اسیدهای سولفوریک و سالیسیلیک به آن اضافه و ترکیب حاصل ۲۴ ساعت شب‌گذران شد. بالون‌هاسپس روی دستگاه گرم‌کننده قرار داده شدند و پنج قطره آب اکسیژنه به هر یک اضافه شد. در فواصل زمانی مشخص مقدار آب اکسیژنه بیش‌تری تا زمان سفید شدن رنگ محلول اضافه شد. سپس در مرحله تقطیر، یون‌های آمونیوم توسط اسیدبوریک جذب شد، و آمونیوم جذب شده در اسیدبوریک، توسط اسیدسولفوریک استاندارد تیتر شد، در نهایت با توجه به میلی‌لیتر اسیدسولفوریک مصرفی برای تیتر نمونه و شاهد و درصد ماده خشک گیاهی، میزان جذب نیتروژن به صورت درصد محاسبه شد.

مقدار کلسیم در محلول حاصل از انحلال خاکستر بافت گیاه با روش کمپلکس‌متری و از طریق تیتراسیون با EDTA اندازه‌گیری شد. ابتدا به محلول مورد آزمایش سود ۴ نرمال و سپس معرف پاتون ریدر اضافه گردید و رنگ محلول به قرمز مایل به صورتی تغییر یافت. تیتراسیون محلول حاصل با EDTA تا تغییر رنگ به آبی خالص ادامه یافت. با توجه به حجم محلول حاصل از انحلال خاکستر و حجم EDTA مصرفی برای تیتراسیون و همچنین درصد ماده خشک گیاهی، میزان جذب کلسیم به صورت درصد محاسبه شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. داده‌های غیر نرمال قبل از استفاده در تجزیه داده، مورد تبدیل داده قرار گرفته و سپس تجزیه واریانس شدند. بررسی همبستگی صفات با استفاده از نرم‌افزار سیگماپلات (SigmaPlot-USA) انجام شد.

نتایج و بحث

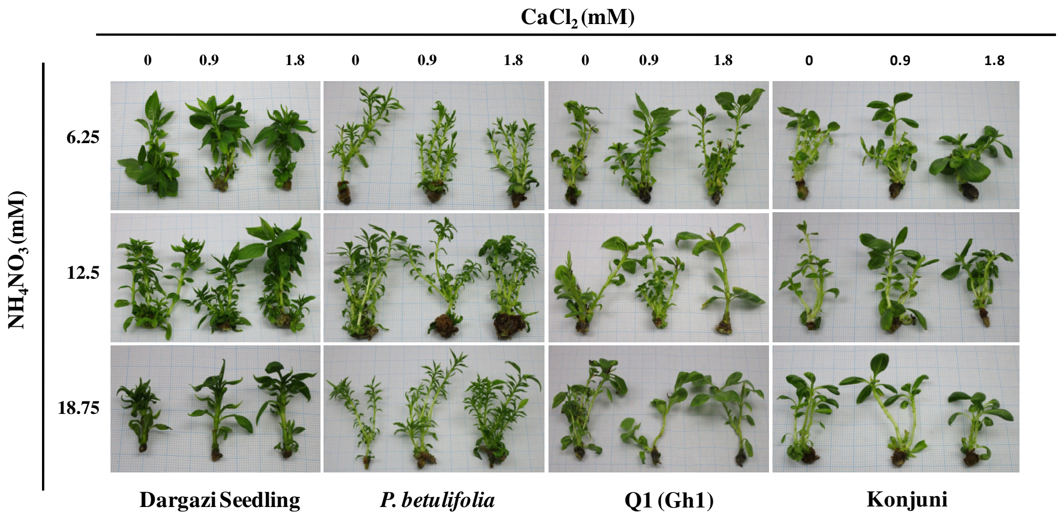
بر اساس نتایج این تحقیق، تفاوت معنی‌داری در رابطه با تمام صفات مورد ارزیابی بین پایه‌های مختلف مورد بررسی مشاهده شد. بیش‌ترین تعداد شاخه‌چه پرآوری شده در پایه Q1 و کم‌ترین آن در پایه *P. betulifolia* ایجاد شد (جدول ۱). همچنین بیش‌ترین رشد شاخه‌چه‌ها در پایه *P. betulifolia* و کم‌ترین آن در دانهال بذری درگزی که در بین پایه‌های مورد بررسی در تحقیق دارای کم‌ترین رشد است، دیده شد. در بررسی انجام شده روی میزان رشد رویشی پایه‌ها در شرایط معمول باغ و شرایط درون شیشه مشاهده شده است که پایه‌های کم‌رشد، به طور معمول در شرایط درون شیشه نیز از رشد رویشی کم‌تری برخوردارند. بر این اساس، پایه پاکوتاه کننده کوئینس C در بین انواع مختلف ژنوتیپ‌های درخت به مورد بررسی، کم‌ترین میزان رشد را در بررسی خسروی‌نژاد و همکاران (Khosravinezhad *et al.*, 2016) نشان داده است. این رشد کم‌تر پایه‌های پاکوتاه در هر دو شرایط باغ و شرایط درون شیشه می‌تواند از پتانسیل ژنتیکی پاکوتاه‌کنندگی آن‌ها منشاء گرفته باشد. همچنین در مشاهدات انجام شده روی پایه Q1 در باغ‌های قزوین، این پایه از رشد رویشی بیش‌تری نسبت به دانهال‌های بذری رقم درگزی برخوردار بود که با مشاهدات این بخش از تحقیق در انطباق است. پایه Q1 از بیش‌ترین میزان توسعه سطح برگ و پایه *P. betulifolia* از کم‌ترین میزان این شاخص برخوردار بود (جدول ۱ و شکل ۱). به طور کلی، توسعه سطح برگ شاخه‌چه‌های درون شیشه از خصوصیات وابسته به خصوصیات رقم یا ژنوتیپ، کیفیت و میزان سازگاری محیط رشد با گونه یا ژنوتیپ مد نظر و همچنین میزان پرآوری است (Abdollahi *et al.*, 2005). به طور معمول، افزایش میزان پرآوری سبب کوچک شدن برگ‌ها و کاهش آن‌ها سبب

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر پایه، نیترات آمونیوم و کلرورکلسیم بر رشد ریزنمونه‌های پایه‌های گلابی در شرایط درون‌شیشه‌ای
Table 1. Mean comparison of the effects of rootstock, NH_4NO_3 and $CaCl_2$ on growth of pear rootstocks *in vitro* condition

تیمار Treatment	تعداد ساقه‌چه Shootlet number	طول ساقه‌چه Shootlet length (cm)	تعداد برگ Leaf number	توسعه برگ Leaf expansion (cm^2)
Rootstock پایه	1.52b	4.15a	15.92a	0.47c
P. betulifolia	1.52b	4.15a	15.92a	0.47c
Q1 (Gh1)	2.75a	3.74b	12.06c	1.28a
Konjuni	2.13ab	3.85ab	11.38c	0.92b
Dargazi Seedling	2.14ab	2.84c	14.60b	0.86b
NH_4NO_3 (mM)				
6.25	2.48a	3.53a	13.32a	0.88a
12.50	2.12ab	3.68a	14.14a	0.86a
18.75	1.80b	3.45a	13.01a	0.91a
$CaCl_2$ (mM)				
0.0	2.12a	3.77a	14.12a	0.75b
0.9	2.42a	3.51a	12.71b	0.94a
1.8	1.86a	3.38a	13.64ab	0.96a

میانگین‌هایی، در هر ستون و برای هر عامل، که دارای حروف مشابه هستند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار ندارند.

Means, in each column and for each factor, followed by similar letters are not significantly different at the 5% probability level, using Duncan`s multiple range test (DMRT).



شکل ۱- تاثیر تیمارهای مختلف نیترات آمونیوم و کلرورکلسیم برخصوصیات مختلف رشدی پایه‌های گلابی در شرایط درون شیشه‌ای
Fig. 1. Effects of various treatments of NH_4NO_3 and $CaCl_2$ on growth characteristics of pear rootstocks *in vitro* condition

توسعه سطح برگ می‌شود، که در این‌جا نتایج مشاهده شده روی پایه *P. betulifolia* خلاف این بوده و علی‌رغم مشاهده کم‌ترین میزان پرآوری روی این پایه، به دلیل ایجاد شاخه‌های

فرعی کوتاه زیاد میزان توسعه سطح برگ پائینی نیز در آن مشاهده شد (شکل ۱). با توجه به این که یکی از مراحل حد واسط در تکثیر درون شیشه پایه‌های مختلف درختان میوه، مرحله طویل شدن شاخه‌چه‌های پرآوری شده (Shoot elongation) است که در ادامه مرحله پرآوری شاخه‌چه‌ها و به منظور افزایش توسعه برگ و کیفیت شاخه‌چه‌های پرآوری شده مد نظر می‌گیرد (Depaoli *et al*., 1994)، به نظر می‌رسد در رابطه با پایه *P. betulifolia* برای افزایش توسعه برگ و انتقال به مرحله ریشه‌زائی استفاده از این مرحله حد واسط از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد.

در محیط‌های کشت درون شیشه بسیاری از گیاهان از جمله شاخه‌چه‌های گلابی، نمک‌های حاوی کلسیم و نیتروژن و نسبت نیترات به آمونیوم نقش مهمی را بر عهده دارد (Leblay *et al*., 1991). در این بررسی استفاده از غلظت‌های تکمیلی نمک‌های نیترات آمونیوم و کلورکلسیم در پرآوری ریزنمونه‌ها پایه‌های مورد بررسی گلابی در محیط پایه QL نشان داد که تاثیر نمک نیترات آمونیوم تنها روی صفت تعداد شاخه پرآوری شده معنی‌دار بوده و افزایش غلظت نمک نیترات آمونیوم، سبب کاهش میانگین میزان پرآوری در پایه‌ها شد (جدول ۱). در بررسی وادا و همکاران (Wada *et al*., 2015b) روی تعیین میزان بهینه دو یون نیترات و آمونیوم در محیط‌های ریزازدیادی پایه‌ها و گونه‌های مختلف گلابی، میزان بالای یون نیترات برای پایه‌ها و گونه‌های مورد بررسی مفید گزارش شد. در حالی که در این بررسی، پایه‌ها و گونه‌های گلابی به میزان پائین‌تری از یون آمونیوم در محیط نیاز داشتند. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد در این مورد تاثیر سوء افزایش یون آمونیوم که گلابی به‌طور معمول به آن حساس است (Leblay *et al*., 1991؛ Abdollahi *et al*., 2006)، بیش از تاثیر مثبت اثر افزایش نیترات بوده است. در شماری از تحقیقات قبلی به عمل آمده روی گلابی، بهترین شرایط برای پرآوری ارقام گلابی در بین محیط‌های مورد بررسی، غلظت‌های کم‌تر نیترات آمونیوم گزارش شده است (Kadota and Niimi, 2003). همچنین استفاده از محیط کشت NN (Nitsch and Nitsch) با غلظت کم‌تر نیترات آمونیوم (۹ میلی مول) در مقایسه با محیط MS (۲۰/۶ میلی مول) به منظور ازدیاد درون شیشه‌ای رقم‌های سکل و لوئیزبون توصیه شده (Abu-Qaoud *et al*., 1991)، که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. لذا به نظر می‌رسد به منظور بهبود کیفیت شاخه‌چه‌های درون شیشه پایه‌های گلابی مورد نظر لازم است دیگر منابع تامین نیترات در محیط کشت که فاقد یون آمونیوم می‌باشند، نظیر نمک نیترات پتاسیم مورد بررسی قرار گیرد.

استفاده از غلظت‌های تکمیلی نمک کلورکلسیم در پرآوری ریزنمونه‌ها پایه‌های مورد بررسی گلابی نشان داد که این نمک تنها

صفات مرتبط با برگ را تحت تاثیر قرار داده و سبب افزایش قابل توجه توسعه سطح برگ پایه‌ها شده است (جدول ۱، شکل ۱). به طور کلی در بررسی دپائولی و همکاران (Depaoli *et al*., 1994) استفاده از محیط QL (Quoirin and Lepoivre, 1977) مناسب‌تر از بسیاری از دیگر محیط‌های کشت برای ارقام معمول گلابی متعلق به گونه *P. communis* گزارش شده است که یکی از دلائل اصلی آن افزایش میزان یون کلسیم در این محیط نسبت به دیگر محیط‌ها نظیر MS بوده است. به نظر می‌رسد نیز در این‌جا نتایج حاصل با بررسی دپائولی و همکاران (۱۹۹۴) و گزارش اخیر وادا و همکاران (Wada *et al*., 2015a) که غلظت‌های بالاتری از کلسیم را در محیط کشت برای گلابی مناسب معرفی کردند، منطبق است. همچنین آن‌چه مسلم است این است که بر اساس نتایج، بیش‌ترین تاثیر افزایش یون کلسیم در صفات کیفی شاخه‌چه‌های درون شیشه است، این در حالی است که در صورتی که هدف افزایش تعداد شاخه‌چه‌های پرآوری شده و بهبود نرخ تکثیر پایه‌ها باشد، این هدف با سهولت بیش‌تری با افزایش در غلظت سایتوکینین BAP، به عنوان مهم‌ترین عامل تاثیر گذار در پرآوری گلابی (Khodaee Chegenee *et al*., 2011) و بسیاری از دیگر گونه‌های درختان میوه معتدله (Depaoli *et al*., 1994) قابل دستیابی است.

معنی‌دار بودن اثر متقابل بین نمک‌های مورد استفاده با پایه‌های گلابی مورد تحقیق تایید کننده نقش اثر ژنتیکی ماده گیاهی در تاثیرپذیری در نوع محیط کشت مورد استفاده بود. بر این اساس، در رابطه با پایه *P. betulifolia*، افزایش نمک نیترات‌آمونیوم سبب افزایش پیوسته خصوصیات رشد و کیفی شاخه‌چه‌ها شد (جدول ۲). این در حالی است که در سه پایه دیگر، به ویژه در دو پایه Q1 و دانهال درگزی، در بالاترین غلظت نمک نیترات‌آمونیوم کاهش خصوصیات رشد و کیفی شاخه‌چه‌ها مشاهده شد. این نتایج و تاثیرپذیری متفاوت نوع گونه گلابی از محیط‌های کشت مورد بررسی در هر دو بررسی وادا و همکاران (Wada *et al*., 2015a,b) روی پایه‌ها و گونه‌های گلابی *P. communis*، *P. cordata*، *P. ussuriensis* و *P. pyrifolia* مشاهده و تایید شده است. اگرچه به نظر می‌رسد ارقام و پایه‌های یک گونه گلابی از یکنواختی رفتار نسبتاً قابل توجه‌تری برخوردار بوده و تعمیم نتایج حاصل از یک رقم یا پایه به دیگر ارقام یا پایه‌ها متعلق به همان گونه از سهولت بیش‌تری برخوردار است (Khodaee Chegenee *et al*., 2011؛ Depaoli *et al*., 1994؛ Abdollahi *et al*., 2005). از طرفی این رفتار متفاوت، بیان کننده لزوم بررسی و تعیین شرایط کشت و ریزازدیادی بهینه پایه‌های متعلق به گونه‌های متفاوت در گلابی است، چنانچه در نهالستان‌های کشت بافتی کشور نیز این مسئله

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع پایه با دو نمک نیترات آمونیوم و کلرورکلسیم بر رشد ریزنمونه‌های پایه‌های گلابی در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 2. Mean comparison of the interaction effects of rootstock with two NH_4NO_3 and $CaCl_2$ salts on growth of pear rootstocks *in vitro* condition

Treatment	تیمار	تعداد ساقه‌چه Shootlet number	طول ساقه‌چه Shootlet length (cm)	تعداد برگ Leaf number	توسعه برگ Leaf expansion (cm^2)
Rootstock	**NH_4NO_3 (mM)**				
	6.25	1.14e	3.76bc	14.79bc	0.39f
P. betulifolia	12.50	1.53de	3.98b	15.56ab	0.42f
	18.75	1.88b-e	4.73a	17.41a	0.60ef
	6.25	3.31a	3.94b	12.70cd	1.28ab
Q1 (Gh1)	12.50	1.85cde	3.92b	12.16d	1.41a
	18.75	3.08ab	3.35bcd	11.33d	1.16bc
	6.25	2.51a-d	3.78bc	11.43d	1.00cd
Konjuni	12.50	2.56a-d	3.71bc	11.40d	0.86d
	18.75	1.32e	4.06ab	11.32d	0.91d
	6.25	2.98abc	2.66d	14.37bc	0.86d
Dargazi Seedling	12.50	2.54ad	3.11cd	17.45a	0.76de
	18.75	0.91e	1.68e	11.98d	0.98cd
Rootstock	**$CaCl_2$ (mM)**				
	0.0	1.15d	4.26a	16.21a	0.48a
P. betulifolia	0.9	2.10bcd	4.13a	15.29a	0.40a
	1.8	1.30d	4.08a	16.25a	0.53a
	0.0	2.12bcd	3.89ab	12.64a	1.12a
Q1 (Gh1)	0.9	3.48a	3.74ab	11.50a	1.38a
	1.8	2.64abc	3.59ab	12.05a	1.35a
	0.0	1.98cd	3.70ab	10.99a	0.74a
Konjuni	0.9	2.24bcd	4.24a	11.58a	0.99a
	1.8	2.18bcd	3.61ab	11.59a	1.04a
	0.0	3.23ab	3.25b	16.65a	0.67a
Dargazi Seedling	0.9	1.85cd	1.95c	12.48a	0.97a
	1.8	1.34d	2.25c	14.67a	0.94a

میانگین‌هایی، در هر ستون و برای هر عامل، که دارای حروف مشابه هستند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار ندارند.

Means, in each column and for each factor, followed by similar letters are not significantly different at the 5% probability level, using Duncan`s multiple range test (DMRT).

طی سال‌های اخیر به خوبی جهت تکثیر انبوه و اقتصادی دیگر گونه‌های گلابی به غیر از گونه گلابی معمولی یا *P. communis* به خوبی مشخص و آشکار شده است. همچنین در اثر متقابل پایه با نمک کلسیم، بیش‌ترین تاثیر در تعداد شاخه‌چه پرآوری شده مشاهده و معمولاً بهترین پرآوری در غلظت میانه این نمک با افزایش ۰/۹ میلی مولار کلرورکلسیم دیده شد (جدول ۲).

در رابطه با اثر متقابل سه فاکتور پایه، نمک نیترات‌آمونیوم و نمک کلرورکلسیم، این اثر متقابل تنها در دو صفت تعداد شاخه‌چه پرآوری شده و توسعه برگ معنی‌دار و بالاترین میزان پرآوری شاخه‌چه‌ها در پایه *P. betulifolia* به میزان ۳/۳ شاخه‌چه به ازاء ریزنمونه در غلظت ۱۸/۷۵ میلی‌مولار نیترات‌آمونیوم و ۰/۹ میلی‌مولار کلرورکلسیم، برای پایه Q1 به میزان ۵/۹ شاخه‌چه به ازاء ریز نمونه در غلظت ۶/۲۵ میلی‌مولار نیترات آمونیوم و ۰/۹ میلی‌مولار کلرورکلسیم، برای پایه کنجونی به میزان ۳/۳ شاخه‌چه به ازاء ریز نمونه در غلظت ۱۲/۵۰ میلی‌مولار نیترات‌آمونیوم و ۱/۸ میلی‌مولار کلرورکلسیم و در نهایت برای پایه دانهال درگزی به میزان ۴/۷ شاخه‌چه به ازاء ریز نمونه در غلظت ۶/۲۵ میلی‌مولار نیترات‌آمونیوم و بدون افزایش تکمیلی یون کلسیم با نمک کلرورکلسیم مشاهده شد (جدول ۳). این در حالی است که الزاماً بالاترین و کم‌ترین میزان توسعه برگ در غلظت‌های فوق از دو نمک، مورد بررسی مشاهده نشد (جدول ۳). این نتایج بیانگر نقش کلیدی و تعیین کننده نمک‌های مناسب در محیط کشت برای دستیابی به صفات مورد نظر نظیر پرآوری و بدون در نظر گرفتن دیگر عواملی نظیر تنظم کننده‌های رشد است. چنانچه تاثیر مشابهی نیز در دو بررسی اخیر وادا و همکاران (Wada *et al.*, 2015a,b) روی دیگر ارقام و گونه‌های گلابی مورد بررسی و گزارش قرار گرفته است.

جذب نیتروژن و کلسیم

مواد گیاهی به طور متوسط دارای ۲ تا ۴ درصد نیتروژن و در حدود ۲ تا ۳ درصد کلسیم در ماده خشک هستند (Marschner, 1995) در حالی که غلظت بحرانی این عناصر در درختان میوه دانه‌دار به ترتیب ۲/۳ و ۱/۴ درصد است (Hagin and Tucker, 1982). در این بررسی، اثر دو نمک نیترات‌آمونیوم و کلرورکلسیم روی جذب و درصد نیتروژن و کلسیم و همچنین اثر نوع پایه روی جذب این عناصر توسط شاخه‌چه‌های درون شیشه معنی‌دار بود. به‌طور طبیعی، بالاترین میزان جذب متوسط نیتروژن در پایه *P. betulifolia* به میزان ۴/۳۱ درصد و بالاترین میزان جذب متوسط کلسیم در پایه بذری درگزی به میزان ۱/۹ درصد بود که در هر دو مورد، بیش از آستانه بحرانی این عناصر در درختان میوه دانه‌دار بر اساس آستانه‌های

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل پایه، نیترات آمونیوم و کلرورکلسیم بر رشد ریزنمونه‌های پایه‌های گلابی در شرایط درون‌شیشه‌ای
Table 3. Mean comparison of the interaction effects of rootstock, NH_4NO_3 and $CaCl_2$ on growth of pear rootstocks *in vitro* condition

پایه‌ها Rootstocks	غلظت NH_4NO_3 Concentration (mM)	غلظت $CaCl_2$ Concentration (mM)	تعداد ساقه‌چه Shootlet Number (No)	توسعه برگ Leaf expansion (cm^2)
P. betulifolia	6.25	0.0	0.76fgh	0.40mno
		0.9	1.57c-h	0.33no
		1.8	1.09d-h	0.45l-o
	12.50	0.0	1.77c-h	0.46l-o
		0.9	1.41c-h	0.31o
		1.8	1.41c-h	0.50j-o
	18.75	0.0	0.93e-h	0.59i-o
		0.9	3.32bcd	0.56j-o
		1.8	1.41c-h	0.66h-o
Q1 (Gh1)	6.25	0.0	1.45c-h	1.14b-f
		0.9	5.97a	1.44ab
		1.8	2.52c-h	1.27b-e
	12.50	0.0	1.99c-h	1.13b-g
		0.9	1.06d-h	1.74a
		1.8	2.49c-h	1.36a-d
	18.75	0.0	2.93b-f	1.10b-h
		0.9	3.41bc	0.96c-j
		1.8	2.91b-f	1.41abc
Konjuni	6.25	0.0	2.30c-h	0.67g-o
		0.9	3.17b-e	1.05b-h
		1.8	2.05c-h	1.30b-e
	12.50	0.0	2.03c-h	0.76f-o
		0.9	2.32c-h	0.90e-l
		1.8	3.33bcd	0.92d-k
	18.75	0.0	1.59c-h	0.79f-m
		0.9	1.22c-h	1.04b-i
		1.8	1.16c-h	0.90e-l
Dargazi Seedling	6.25	0.0	4.74ab	0.57j-o
		0.9	2.49c-h	0.89e-l
		1.8	1.70c-h	1.12b-g
	12.50	0.0	3.04b-f	0.50k-o
		0.9	2.83b-g	0.85e-m
		1.8	1.75c-h	0.93d-k
	18.75	0.0	1.91c-h	0.96c-j
		0.9	0.25h	1.19b-f
		1.8	0.58gh	0.78f-n

میانگین‌هایی، در هر ستون و برای هر عامل، که دارای حروف مشابه هستند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار ندارند.

Means, in each column and for each factor, followed by similar letters are not significantly different at the 5% probability level, using Duncan`s multiple range test (DMRT).

مشخص شده توسط هاگین و تاکر (Hagin and Tucker, 1982) بود (جدول ۴). همچنین افزایش میزان نمک نیترات‌آمونیوم نه تنها سبب افزایش معنی‌دار درصد نیتروژن، بلکه سبب افزایش معنی‌دار کلسیم شد، در حالی که افزایش غلظت نمک کلرورکلسیم تاثیر مشابهی نداشت (جدول ۴).

بالاترین میزان جذب نیتروژن در کلیه پایه‌های مورد مطالعه در بالاترین غلظت‌های نمک نیترات‌آمونیوم مشاهده شد، به صورتی

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر پایه، نیترات آمونیوم و کلرورکلسیم بر جذب نیتروژن و کلسیم در پایه‌های گلابی در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 4. Mean comparison of the effects of rootstock, NH_4NO_3 and $CaCl_2$ on nitrogen and calcium absorption of pear rootstocks *in vitro* condition

تیمارها Treatments	درصد نیتروژن N (%)	درصد کلسیم Ca (%)
Rootstock		
P. betulifolia	4.31a	1.1b
Q1 (Gh1)	3.30c	1.3b
Konjuni	3.97b	0.9b
Dargazi Seedling	3.94b	1.9a
NH_4NO_3 (mM)		
6.25	3.37c	1.2c
12.50	3.77b	1.3b
18.75	4.50a	1.5a
$CaCl_2$ (mM)		
0.0	4.43a	1.4a
0.9	3.57b	1.3a
1.8	3.65b	1.3a

میانگین‌هایی، در هر ستون و برای هر عامل، که دارای حروف مشابه هستند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار ندارند.

Means, in each column and for each factor, followed by similar letters are not significantly different at the 5% probability level, using Duncan`s multiple range test (DMRT).

که برای پایه *P. betulifolia* به میزان ۷/۵۸ درصد، برای پایه Q1 به میزان ۴/۳۱ و برای دو پایه کنجونی و دانهال درگزی به ترتیب ۵/۷۸ و ۶/۲۴ درصد بود (جدول ۵). به طور برعکس، بالاترین درصد کلسیم جذب شده برای سه پایه *P. betulifolia*، Q1 و پایه کنجونی در پائین‌ترین غلظت کلرورکلسیم و تنها برای دانهال درگزی در دو غلظت تکمیلی کلرورکلسیم مشاهده شد (جدول ۵). بررسی همبستگی میزان درصد جذب نیتروژن و کلسیم با صفات رشدی درون‌شیشه پایه‌های مختلف گلابی مورد مطالعه نشان داد که تنها صفت تعداد شاخه پرآوری شده به ازاء ریزنمونه به ترتیب در سطح احتمال ۹۹ و ۹۵ درصد منفی و معنی‌دار بودند (شکل ۲). این همبستگی منفی نشان‌دهنده این است که در پایه‌های مورد مطالعه افزایش زیاد میزان نیتروژن و در سطح پائین‌تری کلسیم سبب کاهش نسبی میزان پرآوری ریزنمونه‌های درون شیشه شده است. از طرفی وجود بالاترین سطح کلسیم در بیش‌تر پایه‌ها در کم‌ترین سطح نیترات آمونیوم نشان دهنده تاثیر منفی این نمک در جذب کلسیم است. به طور کلی جذب کلسیم توسط بافت‌های گیاهان در شرایط محیطی به شدت تعرق گیاه و غلظت یون‌های مثبت مانند NH_4^+ و K^+ که توسط ریشه به سرعت جذب می‌شوند و همچنین به دمای محیط اطراف ریشه وابسته است. مشاهده شده است که بالا بودن سطح یون آمونیوم سبب کاهش جذب کلسیم در بافت‌های گیاهی می‌شود

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل نیترات آمونیوم، کلرورکلسیم و پایه بر جذب نیتروژن و کلسیم در پایه‌های گلابی در شرایط درون شیشه‌ای

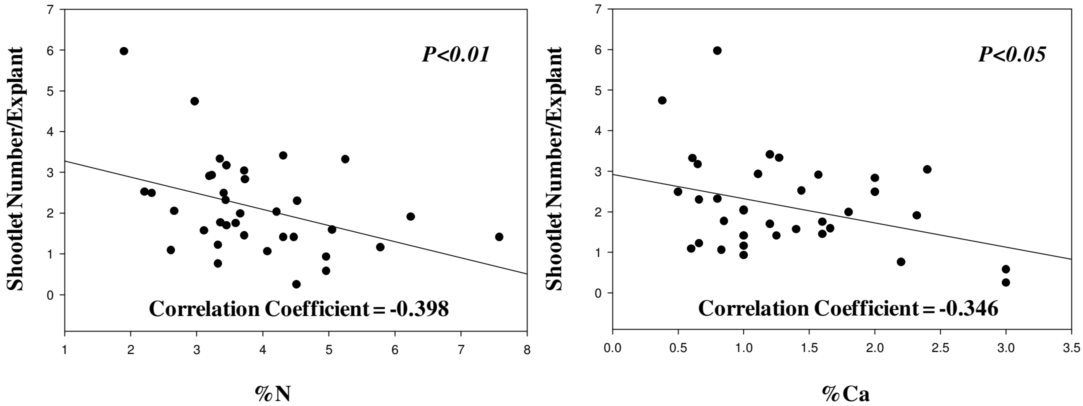
Table 5. Mean comparison of interaction effects of NH_4NO_3, $CaCl_2$ and rootstock on nitrogen and calcium absorption of pear rootstocks *in vitro* conditions

پایه‌ها Rootstocks	NH_4NO_3 Concentration (mM)	$CaCl_2$ Concentration (mM)	درصد نیتروژن N (%)	درصد کلسیم Ca (%)
P. betulifolia	6.25	0.0	3.32i	2.20b
		0.9	3.11i	1.40e
		1.8	2.61j	0.60m
	12.50	0.0	3.36h	0.85j
		0.9	4.31d	1.25f
		1.8	4.47d	1.00i
	18.75	0.0	4.96c	1.00i
		0.9	5.25b	0.61m
		1.8	7.58a	1.00i
Q1 (Gh1)	6.25	0.0	3.72f	1.60d
		0.9	1.90k	0.80k
		1.8	2.21k	1.44e
	12.50	0.0	3.66f	1.80cd
		0.9	4.07e	0.83j
		1.8	3.41h	0.50n
	18.75	0.0	3.23i	1.11h
		0.9	4.31d	1.20g
		1.8	3.19i	1.57e
Konjuni	6.25	0.0	4.52c	0.66l
		0.9	3.45g	0.65l
		1.8	2.66j	1.00i
	12.50	0.0	4.21e	1.00i
		0.9	3.44g	0.80k
		1.8	3.35h	1.27f
	18.75	0.0	5.05b	1.66d
		0.9	3.32i	0.66l
		1.8	5.78b	1.00i
Dargazi Seedling	6.25	0.0	2.97j	0.38o
		0.9	2.32k	2.00c
		1.8	3.45g	1.20g
	12.50	0.0	3.72f	2.40b
		0.9	3.73f	2.00c
		1.8	3.59f	1.60d
	18.75	0.0	6.24ab	2.32b
		0.9	4.51c	3.00a
		1.8	4.96c	3.00a

میانگین‌هایی، در هر ستون و برای هر عامل، که دارای حروف مشابه هستند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار ندارند.

Means, in each column and for each factor, followed by similar letters are not significantly different at the 5% probability level, using Duncan`s multiple range test (DMRT).

(Alarcon *et al.*, 1999). بر اساس مشاهدات انجام شده در رابطه با تاثیر منفی یون آمونیوم، روی میزان جذب کلسیم، به نظر می‌رسد علی‌رغم تاثیر مثبت کلسیم در ریزازدیادی گلابی (Wada *et al.*, 2015a)، لازم است در برنامه تحقیقاتی دیگری غلظت یون کلسیم و همچنین نیترات بدون افزایش غلظت آمونیوم مورد بررسی قرار گیرد. به این‌منظور، استفاده از نمک‌های جایگزین نظیر نیترات‌پتاسیم و نیترات‌کلسیم به میزان کافی، گزینه‌های



شکل ۲- ضریب و نمودار همبستگی صفت تعداد شاخه‌چه پرآوری شده به ازاء ریز نمونه با درصد نیتروژن (چپ) و درصد کلسیم (راست) در پایه‌های گلابی. سطح معنی‌داری همبستگی در گوشه سمت راست هر نموار مشخص شده است.

Fig. 2. Correlation coefficient and graph of shootlet number per explants with percentage of nitrogen (left) and calcium (right) contents in pear rootstocks. The levels of significance are determined at the right angle of each singular graph.

مناسب‌تری برای استفاده در بهبود کیفیت شاخه‌چه‌های درون شیشه گلابی خواهد بود. البته در این بین نقش آنتاگونیستی دو یون کلسیم و پتاسیم نیز در بافت‌های گیاهی لازم است مد نظر قرار داده شود و لذا در صورت امکان استفاده، نمک نیترات کلسیم گزینه مناسب‌تری برای بهبود محیط‌های کشت گلابی به نظر می‌رسد.

References

Abdollahi, H., 2010. Pear, Botany, Cultivars and Rootstocks. Iranian Agricultural Ministry Publications, Tehran, Iran, 210pp. (in Persian).

Abdollahi, H., Atashkar, D., and Alizadeh, A. 2012. Comparison of dwarfing effects of two hawthorn and quince rootstocks on several commercial pear cultivars. Iranian Journal of Horticultural Science 43: 53-63. (in Persian).

Abdollahi, H., Muleo, R., and Rugini, E. 2005. Study of basal growth media, growth regulators and pectin effects on micropropagation of pear (*Pyrus communis* L.) cultivars. Seed and Plant 21: 373-384 (in Persian).

Abdollahi, H., Muleo, R., and Rugini, E. 2006. Optimization of regeneration and maintenance of morphogenic callus in pear (*Pyrus communis* L.) by simple and double regeneration techniques. Scientia Horticulturae 108: 352-358.

Abu-Qaoud, H., Skirvin, R. M., and Below, F. M. 1991. Influence of nitrogen form and NH 4-N/:NO -N ratios on adventitious shoot formation from pear (*Pyrus communis* L.) leaf explants *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: 315-319.

Alarcon, A. L., Madrid, R., Egea, C., and Guillen, I. 1999. Calcium deficiency provoked by the application of different forms and concentrations of Ca^{2+} to soilless cultivated muskmelons. Scientia Horticulturae 81: 89-102.

Babaei, F., Abdollahi, H., and Khorramdel Azad, M. 2011. Detection of pear S-alleles by setting up a revised identified systems. Acta Horticulturae 976: 339-343.

Berardi, G., Infante, R., and Neri, D. 1993. Micropropagation *of Pyrus calleryana* Decne. from seedlings. Scientia Horticulturea 53: 157-165.

Campbell, J. 2003. Pear Rootstocks. AGFACTS, the State of New South Wales Agriculture, Australia. 13pp.

Chevreau, E., Thibault, B., and Arnaud, Y. 1992. Micropropagation of pear (*Pyrus communis* L.). pp. 244-261. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 18. High-Tech and Micropropagation II. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.

Depaoli, G., Rossi, V., and Scozzoli, A. 1994. Micropropagation delle Piante Ortoflotofrutticole. Edagricole, Bologna, Italy, 450pp. (In Italian).

Erfani, J., Ebadi, A., Abdollahi, H., and Fatahi Moghadam, M. R. 2012. Genetic diversity of some pear cultivars and genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers. Plant Molecular Biology Reporter 30: 1065-1072.

Fischer, M. 2009. Pear breeding. pp. 135-160. In: Jain, S. M., and Priyadarshan, P. M. (eds.) Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species. Springer Press, Germany.

Hagin, J., and Tucker, B. 1982. Fertilization of Dryland and Irrigated Soils. Springer-Verlag, New York, USA. 186 pp.

Hancock, J. F., and Lobos, G. A. 2008. Pears. pp. 299-335. In: Hancock, J. F. (ed.) Temperate Fruit Crop Breeding, Germplasm to Genomics. Springer Science Press, USA.

Kadota, M., and Niimi, Y. 2003. Effects of cytokinin types and their concentration on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. Plant Cell, Tissue Organ Culture 72: 261-265.

Khodaee Chegenee, F., Abdollahi, H., Ershadee, A., and Esna Ashari, M. 2011. Determination of micro-propagation protocol for OH×F333 and OH×F69 pear clonal rootstocks. Seed and Plant Production Journal 27-2: 297-312 (in Persian).

Khosravinezhad, F., Abdollahi, H., Kashefi, B., Hassani, M., and Salehi, Z. 2016. Study on *in vitro* propagation of some promising quince (*Cydonia oblonga*) cultivars. Iranian Journal of Horticultural Science 47: 135-144 (in Persian).

Leblay, C., Chevreau, E., and Robin, L. M. 1991. Adventitious shoot regeneration fromin vitro leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25: 99–105.

Mansouryar, M., Erfani-Moghadam, J., Abdollahi, H., and Salami, S. A. 2016. Optimization of *in vitro* micropropagation protocol for some vigorous rootstocks of pear. Iranian Journal of Horticultural Science 47: 361-370.

Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London, UK. 651pp.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nikzad Gharehaghaji, A., Abdollahi, H., Arzani, K., Shojaeiyan, A., Padasht, M. N., Dondini, L., and De Franceschi, P. 2014. Contribution of western and eastern species to the Iranian pear germplasm revealed by the characterization of s-genotypes. Acta Horticulturae 1032: 159-167.

Nourmohammadi, N., Abdollahi, H., Moeini, A., and Roohalamin, E. 2015. Effects of growth media and Fe source on micropropagation and rooting of semi-dwarf pear rootstocks, Pyrodwarf and OH×F87. Seed and Plant Improvement Journal 31-1: 265-278 (in Persian).

Quoirin, M., and Lepoivre, P. 1977. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. Acta Horticulturae 78: 437-442.

Shibli, R. A., Ajlouni, M. M., Jaradat, A., Aljanabi, S., and Shatnawi, M. 1997. Micropropagation in wild pear (*Pyrus syriaca*). Scientia Horticulturae 68: 237-242.

Wada, S., Maki, S., Niedz, R. P., and Reed, B. M. 2015a. Screening genetically diverse pear species for *in vitro* $CaCl_2$, $MgSO_4$ and KH_2PO_4 requirements. Acta Physiologia Plantarum 37: 1-10.

Wada, S., Niedz, R. P., and Reed, B. M. 2015b. Determining nitrate and ammonium requirements for optimal *in vitro* response of diverse pear species. *In Vitro* Cell & Developmental Biology in Plant 51: 19-27.